

PRODUKSI HIDROGEN DARI JERAMI PADI MELALUI HIDROLISIS ENZIMATIK DAN FERMENTASI

Mufnaiti Prihatini, Arief Widjaja ^{*)}

Laboratorium Teknologi Biokimia Program Studi Teknik Kimia, FTI
Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Kampus ITS Sukolilo, Surabaya 60111

^{*)} Coressponding author's email: arief_w@chem-eng.its.ac.id

Abstrak

*Bahan bakar fosil yang sampai saat ini merupakan sumber energi utama, persediaannya semakin menurun. Penggunaan bahan bakar fosil juga telah berkontribusi dalam penurunan kondisi lingkungan. Oleh karena itu perlu mencari sumber energi alternatif yang terbarukan dan ramah lingkungan. Salah satu sumber energi yang potensial menggantikan bahan bakar fosil adalah hidrogen karena ramah lingkungan, terbarukan dan tinggi nilai energi. Dari berbagai metode produksi hidrogen, proses fermentasi merupakan proses yang paling murah dan mudah karena dapat dilakukan pada suhu dan tekanan ambient. Material lignoselulose memegang peranan penting sebagai material substrat untuk produksi biohidrogen karena terbarukan dan keberadaannya berlimpah. Jerami padi merupakan salah satu material lignoselulose dari limbah pertanian yang dapat dimanfaatkan sebagai material substrat. Penelitian ini bertujuan mempelajari hidrolisis enzimatis jerami padi menggunakan crude enzim dan commercial enzim dan memproduksi hidrogen dari hidrolisat jerami padi menggunakan *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534 secara fermentatif. Rangkaian penelitian meliputi pembuatan larutan enzim baik murni (komersial) maupun kasar dari *Trichodema reesei* dan *Aspergillus niger*, pretreatment jerami padi dengan NaOH 1% pada temperatur 60°C selama 8 jam, hidrolisis enzimatis jerami padi hasil pretreatment pada temperatur 60°C, pH 3 serta konsentrasi enzim 93 U/5g jerami padi, dan fermentasi hidrolisat jerami padi menggunakan *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534 untuk menghasilkan hidrogen pada temperatur 30°C, pH 6 dan konsentrasi gula reduksi 6 g/L. Enzim xilanase dan selulase dari *A. niger* yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai aktivitas masing-masing 1,8 U/ml dan 2 U/ml. Yield hidrolisis sebesar 0,39 g gula reduksi/ g jerami padi. Yield hidrogen 0,23 mol H₂/mol gula reduksi.*

Kata kunci : *Hidrogen, Enterobacter aerogenes NBRC 13534, fermentasi, hidrolisis, jerami padi.*

I. PENDAHULUAN

Bahan bakar fosil yang sampai saat ini merupakan sumber energi utama, persediaannya semakin menurun. Penggunaan bahan bakar fosil juga telah berkontribusi dalam penurunan kondisi lingkungan. Oleh karena itu perlu mencari sumber energi alternatif yang terbarukan dan ramah lingkungan. Salah satu sumber energi yang potensial menggantikan bahan bakar fosil adalah hidrogen karena ramah lingkungan (hasil pembakaran berupa H₂O), terbarukan (diperoleh dari berbagai sumber yang terbarukan) dan tinggi nilai energi yaitu 122 KJ/g, atau 2.42 kali lebih besar daripada bahan bakar hidrokarbon metana (Ruggeri, 2008).

Dari berbagai metode produksi hidrogen, proses fermentasi merupakan proses yang paling murah dan mudah, karena dapat dilakukan pada suhu dan tekanan ambient (Chen dkk., 2006). Material lignoselulose memegang peranan penting sebagai material substrat untuk produksi biohidrogen khususnya dalam perkembangan biofuel karena dapat diperbaharui dan keberadaannya berlimpah. Jerami padi merupakan salah satu material lignoselulose dari limbah pertanian yang dapat dimanfaatkan sebagai material substrat. Jerami padi mengandung 43.38% selulosa; 24.73% hemiselulosa dan 9.67% lignin (Anwar, 2010). Fermentasi secara langsung jerami padi tidak efisien karena selulosa dan hemiselulosa tidak dapat langsung dikonversi oleh bakteri penghasil energi secara instan. Oleh karena itu akan lebih *feasible* menggunakan 2 tahap proses produksi, pertama yaitu material berselulosa dihidrolisis melalui metode fisika-kimia atau biologi, diikuti langkah konversi energi secara fermentasi (Ren, 2009).

Dewasa ini penelitian tentang produksi hidrogen dengan menggunakan proses fermentasi berkembang dengan pesat. Hidrogen dapat diperoleh dengan cara fermentasi dengan yield 1,36–3,02 mol H₂/mol glukosa (Chin dkk., 2003; Morimoto dkk., 2004; Ogino dkk., 2005; Kotay dan Das, 2006; Zhang dkk., 2006), 1,3–4,8 mol H₂/mol sukrosa (Sung dkk., 2002; Lin dan Lay, 2004a; Ogino dkk., 2005); 0,73–2,19 mol H₂/mol xilosa (Lin dkk., 2008; Lo dkk., 2008; Ren dkk., 2009); 1,1–1,5 mol H₂/mol heksosa (Mahakhan dkk., 2005; Lin dkk., 2008) masing-masing dari glukosa, sukrosa, xilosa atau pati ubi kayu. Mempertimbangkan bahwa

selulosa utamanya disusun oleh glukosa dan hemiselulosa disusun oleh xilosa dan sejumlah kecil gula lain, maka sangat potensial jika keduanya dikonversi menjadi hidrogen melalui hidrolisis enzimatis dan fermentasi.

Penelitian ini bertujuan mempelajari hidrolisis enzimatis jerami padi menggunakan *crude* enzim dan *commercial* enzim dan memproduksi hidrogen dari hidrolisat jerami padi menggunakan *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534 secara fermentatif.

II. METODOLOGI

Penyiapan Jerami

Jerami padi dijemur 4 hari, dipotong kurang lebih 2 mm menggunakan pemotong kertas, digiling menggunakan penggiling biji-bijian kemudian diayak 100 -120 mesh. Jerami kemudian didelignifikasi menggunakan NaOH 1% pada temperatur 60 °C selama 8 jam dalam labu Erlenmeyer yang dilengkapi dengan kondensor refluks, kemudian dicuci dengan air kran sampai netral dan terakhir dicuci menggunakan aquades. Jerami dipisahkan menggunakan penyaring kain kemudian dikeringkan pada 100 °C selama kurang lebih 8 jam. Analisa selulosa, hemiselulosa dan lignin menggunakan metoda *Chesson*.

Penyiapan Campuran *Crude Enzyme*

Jamur yang digunakan untuk memproduksi selulase pada penelitian adalah *T. reesei* dan *A. niger*. Keduanya dikembangkan pada media *potato dextrose agar* (PDA) miring selama tujuh hari. Enzim dipersiapkan dengan cara menginkubasi *T. reesei* maupun *A. niger* dalam media padat jerami padi dengan larutan nutrisi yang digunakan mengandung 1,0 g ekstrak ragi; 1,5 g *bacteriological peptone*; 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mL larutan CMC 1% dalam tiap liter larutan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5. Lima gram serbuk jerami padi dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL kemudian ditambahkan 25 mL larutan nutrisi. Campuran tersebut disterilisasikan pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Bibit *A. niger* dan *T. reesei* dalam agar miring diinokulasikan secara aseptik ke medium dalam labu Erlenmeyer. *T. reesei* diinkubasi selama 6 hari sedangkan *A. niger* diinkubasi selama 8 hari. Enzim dipanen menggunakan 100 mL larutan Tween 80 1% dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 dan *dishaker* pada 175 rpm selama 135 menit. Campuran enzim kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 menit dan disaring untuk mendapatkan *crude enzyme* (supernatan). Aktivitas enzim diuji berdasarkan aktivitas CMCase, satu unit aktivitas (U) didefinisikan sebagai 1 μmol glukosa yang dihasilkan dari degradasi CMC tiap menit pada temperatur pengujian 35 °C. Jumlah glukosa yang dihasilkan ditentukan menggunakan dinitrosalicylic acid (DNS), diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. *Crude enzyme* dari *T. reesei* dicampur dengan *crude enzyme* dari *A. niger* dengan perbandingan 2 : 1 U/U. Pada saat tidak digunakan, enzim disimpan pada suhu 4 °C.

Penyiapan *Commercial Enzyme*

Enzim komersial yang digunakan sebagai pembanding pada percobaan ini adalah selulase dari *A. niger* berlabel Fluka Biochemika dan *T. reesei* berlabel Sigma Aldrich. Enzim ini dilarutkan dalam 100 ml buffer sitrat 0,1 M dengan pH = 5,5 sehingga diperoleh aktivitas enzim masing-masing 2,0 dan 2,6 U/mL.

Hidrolisis

Hidrolisis dilakukan dalam erlenmeyer dan di refluks. Lima gram jerami padi yang telah didelignifikasi dicampur dengan enzim pada konsentrasi 93U/5gr jerami dan volume cairan 250 ml. Hidrolisis dilakukan pada 60°C, pH 3, selama 48 jam. Diaduk menggunakan magnetik stirer. Sampel diambil 0,2 mL setiap 3 jam selama 48 jam, kemudian dianalisis kandungan gula reduksinya menggunakan DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Fermentasi

Fermentasi dilakukan dalam reaktor *batch* pada suhu 30°C, pH dijaga rentang 5,5-6,0 menggunakan NaOH 4 M. Bakteri yang digunakan yaitu *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534 (hibah dari Prof. Hirayasu Ogino, Osaka Prefecture University Jepang). Bibit yang akan digunakan, ditumbuhkan kembali selama satu hari. *Enterobacter aerogenes* diaklimatisasi dengan volume 100 ml. medium yang digunakan adalah hidrolisat jerami padi yang mengandung 5 g/L ekstrak ragi dan ferrosulfat 0,35 g/L. Gas yang dihasilkan ditampung dalam sampling bags (*CEL Scientific Tedlar gas sampling bags*). Setiap selang waktu 6 jam dilakukan pengambilan sampel untuk mengukur konsentrasi gula reduksi dan sel. Analisis kadar gula menggunakan metode DNS sedangkan konsentrasi sel menggunakan spektrofotometer, volume hidrogen dalam *bags* diukur menggunakan sistem pemindahan air dan persen H_2 dihitung dengan cara membandingkan sampel bihidrogen dan standart hidrogen murni menggunakan *Gas Chromatography* GC-2010A Shimadzu, detektor TCD (*Thermal Conductivity Detector*).

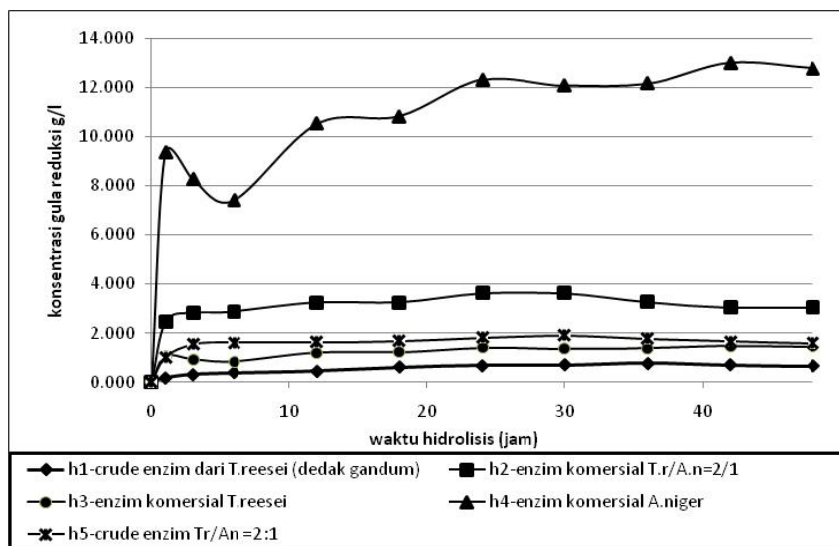
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hidrolisis enzimatik

Sebelum dilakukan hidrolisis enzimatik, terlebih dulu dilakukan *pretreatment* pada jerami padi yang meliputi *pretreatment* secara fisika (mereduksi ukuran jerami hingga 100-120 mesh) dan *pretreatment* kimiawi (menggunakan NaOH 1%). Tujuan *pretreatment* fisika untuk mempermudah degradasi enzimatis oleh enzim selulase, karena ukuran yang kecil akan memperluas permukaan kontak antara enzim dengan substrat sehingga mempermudah enzim dalam mendegradasi jerami padi menjadi gula reduksi. Sedangkan *pretreatment* kimiawi untuk merusak lignin, sehingga enzim yang digunakan untuk menghidrolisis dapat mencapai rantai yang diinginkan yaitu hemiselulosa dan selulosa. Dari analisa chesson diperoleh hasil bahwa terjadi penurunan kandungan lignin jerami padi setelah pengolahan awal dari 16,84% menjadi 9,43%, sedangkan kandungan hemiselulosa dan selulosa masing-masing naik dari 32,69% menjadi 36,23% dan 45,94% menjadi 54,13%.

Jerami padi hasil *pretreatment* digunakan sebagai substrat untuk hidrolisis. Hidrolisis dilakukan pada kondisi pH 3 dan suhu 60°C, seperti yang dilakukan pada penelitian kami sebelumnya bahwa ini adalah kondisi optimum untuk hidrolisis jerami padi. Pada hidrolisis ini, hemiselulosa dan selulosa didegradasi oleh enzim selulase dan xylanase yang dihasilkan *A. niger* maupun *T. reesei* menjadi glukosa dan xylosa (gula reduksi). Hidrolisis selulosa terdiri dari dua tahap, yaitu degradasi selulosa menjadi selobiosa oleh endo- β -1,4-glukanase dan ekso- β -1,4 glukanase kemudian dilanjutkan dengan pemecahan selobiosa oleh β -1,4 glukosidase menjadi glukosa. **Gambar 1** menunjukkan konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis enzimatis jerami padi menggunakan beberapa macam enzim. Dapat dilihat bahwa hidrolisis menggunakan enzim komersial *A.niger* menghasilkan gula reduksi paling baik, konsentrasi gula reduksi yang tertinggi yaitu 13,02 g/L dalam waktu 42 jam. Perolehan gula reduksi ini lebih baik dari enzim atau campuran enzim yang lain juga disebabkan adanya aktivitas yang tinggi dari *A.niger*, sehingga makin tinggi pula gula yang dihasilkan. Ditunjukkan pula pada gambar tersebut bahwa konsentasi gula reduksi yang dihasilkan pada hidrolisis jerami padi oleh tiap enzim berbeda meskipun konsentrasi enzim dalam larutan sama, yaitu 93 U/ 5g jerami padi. Hal ini dapat disebabkan komposisi masing-masing dari 3 komponen enzim, yaitu eksoglukanase, endoglukanase, selobiohidrolase dan β glukosidase berbeda. Karena strainnya juga berbeda.

Oleh karena enzim komersial dari *A.niger* menghasilkan konsentrasi gula reduksi tertinggi, maka untuk proses fermentasi selanjutnya dipakai hidrolisat jerami padi menggunakan enzim komersial dari *A.niger* dan didapatkan yield 0,39 g gula reduksi/ g jerami padi.



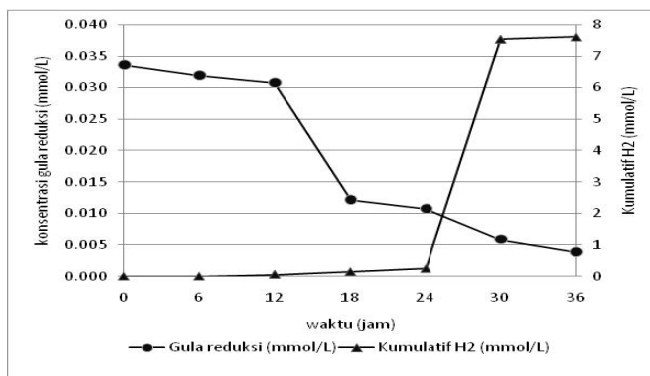
Ferm Gambar 1. Konsentrasi glukosa oleh berbagai jenis enzim pada hidrolisis jerami padi

Konsentrasi substrat awal (gula reduksi) yang digunakan untuk fermentasi sebesar 6 g/L. Gula reduksi ini merupakan hasil hidrolisis jerami padi oleh enzim komersial *A. niger*. Fermentasi hidrogen oleh bakteri *E.aerogenes* NBRC 15354 dilakukan pada kondisi pH 6 dan temperatur 30°C. Bakteri *E.aerogenes* NBRC 15354 merupakan bakteri anaerob fakultatif, oleh karena itu sebelum diinokulasikan bakteri, substrat perlu diflushing menggunakan N₂ untuk menghilangkan oksigen yang terlarut dalam substrat maupun yang ada pada headspace reaktor. pH merupakan faktor penting dalam proses fermentasi. pH mempengaruhi proses metabolisme sel dalam memproduksi hidrogen. pH 6 baik untuk pertumbuhan sel *E.aerogenes*

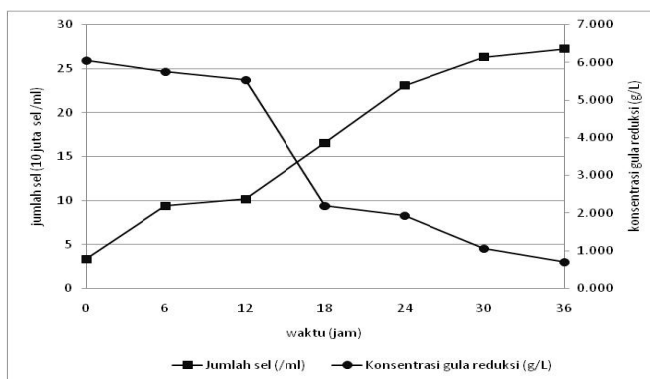
(Converti, 2002). pH 6 dijaga dengan menggunakan larutan buffer sitrat dalam substrat serta di tambahkan NaOH 4 M jika terjadi sedikit penurunan pH selama fermentasi berlangsung.

Hidrogen oleh bakteri *E.aerogenes* NBRC 15354 dihasilkan melalui dua jalur (*pathway*) yaitu NADH *pathway* dan format *pathway*. Glukosa yang terkandung di dalam substrat diubah menjadi asam piruvat melalui proses glikolisis menghasilkan 2 NADH dan 2 ATP. Dalam kondisi anaerob, sebagian piruvat diubah oleh enzim *piruvate format lyase* (PFL) menghasilkan asam format dan *asetil coenzym-A* (AcCoA). Selanjutnya AcCoA diubah menjadi asam asetat dan etanol. Sebagian piruvat yang lainnya diubah menjadi asam laktat. Selain itu, sel juga memproduksi asam suksinat. Selanjutnya format dapat diubah menjadi gas hidrogen dan CO₂. Hal tersebut dikenal dengan sebutan format *pathway*. Pada NADH *pathway*, hidrogen dapat dievolusi dari NADH yang telah mengalami proses oksidasi dengan melepaskan proton H⁺. Yield maksimum yang bisa diperoleh dengan bakteri fakultatif adalah 2 mol H₂/mol glukosa dari format *pathway* dan 2 mol H₂/mol glukosa dari NADH *pathway* (Mathews dan Wang., 2009).

Gambar 2 menunjukkan terjadinya penurunan konsentrasi gula reduksi seiring dengan penambahan jumlah kumulatif hidrogen yang dihasilkan. Ditunjukkan pula bahwa produksi gas sangat lambat sampai jam ke 24 kemudian terjadinya kenaikan secara tajam jumlah hidrogen dari jam 24 ke jam 30. Hal ini dikarenakan pada awal fermentasi gas masih terjebak dalam larutan, dapat dilihat dari gelembung gas yang terakumulasi dalam fermentor. Kemudian dapat terlepas pada jam 24. **Gambar 3** menunjukkan terjadinya penurunan konsentrasi gula reduksi seiring dengan penambahan jumlah sel. Metabolisme sel menyebabkan penurunan konsentrasi substrat.



Gambar 2. Perubahan konsentrasi gula reduksi dan konsentrasi H₂ terhadap waktu fermentasi



Gambar 3. Perubahan konsentrasi gula reduksi dan jumlah sel terhadap waktu fermentasi

IV. KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa produksi hidrogen dari jerami padi melalui hidrolisis enzimatik dan fermentasi dapat dilakukan melalui pengembangan metode yang sederhana dengan yield gula reduksi sebesar 0,39 g gula reduksi/g jerami padi serta yield hidrogen sebesar 0,26 mmol H₂/ mmol gula reduksi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anwar, N., Widjaja, A., Winardi, S., “Study of The Enzymatic Hydrolysis of Alkaline Pretreated Rice Straw Using Cellulase of Various Sources and Compositions”, International Review of Chemical Engineering Vol. 3.N.2. March 2011
2. Chen, W.H., S.Y. Chen, S.K. Khanal, S.Sung (2006), “Kinetic Study of Biological Hydrogen Production by Anaerobic Fermentation”, International Journal of Hydrogen energy, Vol. 31, pp. 2170-2178.
3. Converti, A., P. Parego (2002), “Use of Carbon and Energy Balances in the Study of the Anaerobic Metabolism of *Enterobacter aerogenes* at Variable Starting Glucose Concentrations” Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 59, pp. 303–309
4. Kotay, S.M., D. Das (2006), “Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge”, Bioresource Technology, Elsevier.
5. Kumar, N., D. Dass (2000), “Enhancement of Hydrogen Production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08”, Process Biochemistry 35, 589–593.
6. Lin, C.Y., C.H. Hung, C.H. Chen, (2006), “Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures”, Process Biochemistry, Vol. 41, pp. 1383–1390.
7. Matthews, J., G. Wang (2009), “Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production”, International Journal of Hydrogen Energy, Vol 34, pp 7404 – 7416.
8. Nakashimada, Y., M.A. Rachman, T. Kakizono, N. Nishio (2002), “Hydrogen Production of *Enterobacter Aerogenes* Altered by Extracellular and Intracellular Redox States”, International Journal of Hydrogen Energy 27 (2002) 1399 – 1405.
9. Nath, K., D. Das (2004), “Improvement of Fermentative Hydrogen Production: Various Approaches”, Appl Microbiol Biotechnol, 65: 520–529.
10. Ogino, H., T. Miura, K. Ishimi, M. Seki, H. Yoshida (2005), “Hydrogen Production from Glucose by Anaerobes”, Biotechnology Progress, Vol. 21, pp. 1786–1788.
11. Prakasham, R., P. Brahmaiah (2009), “Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio”, Hydrogen Energy 34, 9354-9361.
12. Ren, Yunli., Jianji Wang, “Hydrogen production from monomeric sugar hydrolyzed from hemicelluloses by *Enterobacter aerogenes*”, Int Journal of Renewable Energy 2009;34: 2774-2779.
13. Ruggeri, B. (2008), “Experimental kinetics and dynamics of hydrogen production on glucose by hydrogen forming bacteria (HFB) culture”, International journal of Hydrogen Energy, vol. 34, pp 753-763
14. Thauer, R. (1977), “Limitation of microbial H₂ formation via fermentation” In H.G. Schlegel, & J. Barnea (Eds.), Microbial energy conversion, (pp. 201–204). New York: Pergamon Press.
15. Widjaja, Arief (2009), “Aplikasi Bioteknologi pada Industri Pulp dan Kertas”, itspress, Surabaya.
16. Yokoi, H. A. Saitsu, H. Uchida, J. Hrose, S. Hayashi, Y. Takasaki (2001) “Microbial Hydrogen Production from Sweet Potato Starch Residue”, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 91, No. 1, 58-63.
17. Zhang, H., M.A. Bruns, B.E. Logan (2006), “Biological Hydrogen Production by *Clostridium acetobutylicum* in an Unsaturated Flow Reactor”, Water Research, Vol. 40, pp 728 – 734.